

迎红杜鹃花色素组成及花色在开花过程中的变化

李崇晖^{1,2}, 王亮生^{1*}, 舒庆艳¹, 徐彦军³, 张洁^{1,4}

(¹ 中国科学院植物研究所北京植物园, 北京 100093; ² 中国科学院研究生院, 北京 100049; ³ 中国农业大学理学院, 北京 100094; ⁴ 西北农林科技大学理学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 分析了迎红杜鹃 (*Rhododendron mucronulatum* Turcz.) 的花色素组成, 调查了其在开花过程中花色、花色素组成和含量的变化。采用英国皇家园艺学会比色卡和分光色差计测量了不同开花阶段的花色。结果表明, 开花过程中花色的明度增加, 彩度变小, 由红紫 (70B) 变为淡紫红色 (84B)。用高效液相色谱—光电二极管阵列检测技术 (HPLC-PAD) 和高效液相色谱—电喷雾离子化—质谱联用技术 (HPLC-ESI-MS) 分析花瓣中花青苷和黄酮醇的组成及含量。在 520 nm 和 350 nm 波长下, 共检测到 15 种化合物: 5 种花青苷、8 种黄酮醇和 2 种芳香酸, 推定出了其中 10 种化合物。花青苷: 锦葵素 3-阿拉伯糖苷-5-葡萄糖苷; 黄酮醇: 杨梅黄素 3-半乳糖苷和杨梅黄素 3-鼠李糖苷; 槲皮素 3-半乳糖苷、槲皮素 3-葡萄糖苷和两种槲皮素-鼠李糖苷以及山奈酚 3-鼠李糖苷; 芳香酸: 绿原酸及其异构体。未检测到酰基化色素及 5-O-甲基化黄酮醇。在 6 个开花阶段中, 虽然花色变化明显, 但花色素种类不变, 其含量在各阶段差异极显著。从小蕾期到初花期, 总花青苷含量 (TA) 和总黄酮醇含量 (TF) 迅速减少, 花开放后变化平稳。基于花色素组成信息, 探讨了耐寒杜鹃的花色育种策略。

关键词: 迎红杜鹃; 花青苷; 类黄酮; 花色; 液质联用

中图分类号: S 685.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 07-1023-08

Pigments Composition of Petals and Floral Color Change During the Blooming Period in *Rhododendron mucronulatum*

LI Chong-hui^{1,2}, WANG Liang-sheng^{1*}, SHU Qing-yan¹, XU Yan-jun³, and ZHANG Jie^{1,4}

(¹ Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ² Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³ College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ⁴ College of Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The floral color of *Rhododendron mucronulatum* Turcz. was investigated in terms of its presentation, pigments composition, changes in the composition during blooming season. The floral color was measured according to the Royal Horticultural Society Colour Chart (RHSCC) and then by a NF333 spectrophotometer. The results indicated that floral lightness increased, while the value of chroma decreased during the blooming period, and floral color turned from red purple (70B) to violet (84B) at the meantime. A high performance liquid chromatography with a photodiode array detector (HPLC-PAD) and HPLC electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) methods were employed for qualitative and quantitative analysis of anthocyanins and flavonols. In total, 15 compounds were detected at 520 nm and 350 nm in the petals: five anthocyanins, eight flavonols and two aromatic acids. Ten of them were tentatively identified, including one anthocyanin (malvidin 3-arabinoside-5-glucoside), eight flavonols (myricetin 3-galactoside, myricetin 3-rhamnoside, quercetin 3-galactoside, quercetin 3-glucoside, two quercetin-rhamnosides and kaempferol 3-rhamnoside), and two aromatic acid (chlorogenic acid and its isomer). No acylated pigments and 5-O-methylated flavonols were detected. Although the floral color changed significantly in the six blooming stages, the pigment

收稿日期: 2008-04-02; 修回日期: 2008-05-22

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wangls@ibcas.ac.cn)

composition kept unchanged, and the pigment content showed significant difference from the initiation of floral buds to the late opening of flowers. Total anthocyanins content (TA) and total flavonols content (TF) decreased rapidly during the first three stages, and then changed smoothly. The floral color breeding strategies for cultivars with cold resistance were discussed based on the pigment composition of *R. mucronulatum*.

Key words: *Rhododendron mucronulatum*; anthocyanin; flavonoid; floral color; HPLC - MS

迎红杜鹃 (*Rhododendron mucronulatum*) 花萼红或淡紫红色, 早春先叶开放, 耐寒性强, 在北方可露地栽培。但花色单一, 限制了其在园林中的应用。花色测定和花色素组成分析有助于阐明其花色形成机理, 也是进行杜鹃新花色育种的依据之一, 而目前未见对迎红杜鹃的花色和花色素组成的研究报道。

根据对杜鹃属其它植物花色的研究, 少数野生种和栽培品种的花中检测到的花青苷元有: 矢车菊素 (Cyanidin, 简称 Cy)、飞燕草素 (Delphinidin, 简称 Dp)、芍药花素 (Peonidin, 简称 Pn)、锦葵素 (Malvidin, 简称 Mv)、矮牵牛素 (Petunidin)。它们通常以 3-葡萄糖苷、3-半乳糖苷、3-阿拉伯糖苷、3, 5-二葡萄糖苷和 3-半乳糖苷-5-葡萄糖苷等形式存在, 有时被咖啡酸等酰化 (Harborne, 1962; de Loose, 1970; Hayashi, 1988)。主要的类黄酮成分是黄酮醇: 杨梅黄素 (Myricetin, 简称 My)、槲皮素 (Quercetin, 简称 Qu) 和山奈酚 (Kaempferol, 简称 Km) 及这 3 种黄酮醇的 5-O-甲基化衍生物。黄酮醇通常以 3-半乳糖苷、3-鼠李糖苷和 3-芸香糖苷等形式存在 (Harborne, 1962; de Loose, 1970; Swaroop et al., 2005)。6-OH-槲皮素 3-半乳糖苷则是杜鹃属花的主要黄色色素 (Harborne, 1965), β -胡萝卜素又是深黄色花 *R. japonicum* f. *flavum* 的主要色素 (Miyajima et al., 2000)。

作者利用高效液相色谱—光电二极管阵列检测技术 (HPLC - PAD) 及高效液相色谱—电喷雾离子化—质谱联用技术 (HPLC - ESI - MS), 分析了迎红杜鹃的花色素成分, 调查了其在开花过程中的变化, 并在此基础上探讨了杜鹃新花色育种的目標及策略。

1 材料与方法

1.1 植物材料

迎红杜鹃新鲜花瓣于 2007 年 3 月下旬至 4 月上旬采自中国科学院植物研究所北京植物园。选取 5 株生长环境相同、长势一致、花蕾数多的植株, 依次采集小蕾期、大蕾期、初开期、半开期、全开期和末花期 6 个开花阶段的花瓣, 迅速带回实验室测色, 然后用液氮磨碎, 直接提取色素。

1.2 花色测定

采用英国皇家园艺学会比色卡 (Royal Horticultural Society Colour Chart, 简称 RHSCC) 与新鲜花瓣中间部分花色进行对比。参照 Zhang 等 (2007) 的方法用 NF333 型分光色差计 (日本电色工业株式会社), 测定花色的明度 L^* 值、色相 a^* 、 b^* 值, 并计算彩度 C^* 和色相角 h , 重复测定 5 次。

1.3 花色素提取与 HPLC - PAD、HPLC - ESI - MS 分析

1.3.1 样品的准备 新鲜花瓣用液氮磨碎, 参照 Zhang 等 (2007) 的提取方法并稍有改进: 每隔 12 h 振荡 1 次。色素抽提液保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 用于花色素的 HPLC - PAD 分析及黄酮醇的 HPLC - ESI - MS 分析。

1.3.2 花青苷定性分析所用样品的纯化 参照 Pomar 等 (2005) 的方法稍做改进: $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中浸提过夜, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸干, 2% 甲酸水溶液溶解残留物, 乙酸乙酯萃取除去黄酮醇。溶于水相的花青苷浓缩后用 Envi-18 C_{18} SPE 萃取小柱吸附 (上海安谱科学仪器有限公司, 规格: $500\text{ mg}/3\text{ mL}$), 2% 甲酸水溶液洗脱除杂。纯化后的花青苷混合物样品, 保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于 HPLC - ESI - MS 分析。

1.3.3 HPLC - PAD 和 HPLC - ESI - MS 分析 经 1.3.1 准备的色素抽提液样品用 Dionex HPLC - PAD 系统分析。分析条件: 色谱柱: TSK gel ODS-80Ts QA, 4.6 mm (内径) × 150 mm (长) (日本 Tosoh 株式会社)。流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 40°C , 进样体积 $10 \mu\text{L}$ 。检测波长: 520 nm (花青苷) 和 350 nm (黄酮醇), $200 \sim 800 \text{ nm}$ 范围内全波长扫描吸收光谱。流动相参考 Fossen 和 Andersen (1998) 的文献。洗脱程序: 0 min , 16% B; 30 min , 35% B; 38 min , 43% B; 45 min , 57% B。

采用 Agilent 1100 LC/MSD Trap VL 液-质联用仪进行 HPLC - ESI - MS 分析。液相色谱分析条件: 色谱柱、流速、进样体积和检测波长同上, 柱温 35°C 。流动相参考 Macz-Pop 等 (2006) 的文献, 并稍有改进, B 液: 甲醇。花青苷洗脱程序: 0 min , 22% B; 25 min , 36% B; 35 min , 55% B; 黄酮醇洗脱程序: 0 min , 22% B; 40 min , 47% B。质谱分析条件: 电喷雾离子化 (ESI), 离子阱分析器, 正离子检测模式, 全离子扫描范围 (m/z): $100 \sim 1\,000$; CID 裂解能量 30%, 选择离子检测 (SIM) 方式监测选定离子的 MS^2 碎片。

1.4 花色色素含量测定

用 HPLC 法测定, 分析条件同 1.3.3。分别以 520 nm 和 350 nm 同时检测总花青苷含量 (total anthocyanins, TA) 和总黄酮醇含量 (total flavonols, TF)。采用标准品半定量法分别计算每 100 mg 新鲜花瓣中含有的, 相对于标准品锦葵素 3, 5 - 二葡萄糖苷 (Mv3G5G, 法国 Extrasynthese 公司) 和芦丁 (槲皮素 3 - 芸香糖苷, 中国药品生物制品检定所) 的 TA 和 TF (%), 重复 5 次。并据公式 $\text{CI} = \text{TF}/\text{TA}$ 计算辅助色素效应指数 (CI) (Zhang et al., 2007)。

1.5 数据分析及作图

应用 Microsoft Office Excel 2003 及 Origin 7.5 进行数据整理及作图, 用 SPSS 11.5 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 开花过程中花色的变化

根据花色测定结果 (表 1), 迎红杜鹃开花过程中花色的 RHSCC 值从小蕾期的 70B (red-purple 组) 变到末花期的 84B (violet 组)。

表 1 开花过程中不同阶段的花色变化

Table 1 Floral color changes during the blooming season

开花阶段 ¹ /(cm × cm) Blooming stages ¹	RHSCC	CIE $L^* a^* b^*$ 表色系统 ² CIE $L^* a^* b^*$ coordinate ²				
		L^*	a^*	b^*	C^*	h°
小蕾期(0.558 × 1.089) Small bud stage	70B	$31.87 \pm 2.94\text{B}$	$28.43 \pm 1.25\text{A}$	$-6.96 \pm 1.20\text{A}$	$29.28 \pm 1.47\text{AB}$	$-13.70 \pm 1.78\text{A}$
大蕾期(0.712 × 1.518) Big bud stage	78B	$35.43 \pm 1.51\text{B}$	$29.71 \pm 1.71\text{A}$	$-10.05 \pm 0.50\text{B}$	$31.36 \pm 1.76\text{A}$	$-18.70 \pm 0.54\text{B}$
初花期(1.213 × 2.037) Early blooming stage	82B	$47.98 \pm 2.36\text{A}$	$22.79 \pm 2.16\text{B}$	$-13.82 \pm 0.95\text{C}$	$26.66 \pm 2.30\text{B}$	$-31.30 \pm 1.12\text{C}$
半花期(1.695 × 2.012) Half blooming stage	84B	$52.35 \pm 1.83\text{A}$	$18.46 \pm 2.71\text{C}$	$-10.66 \pm 1.64\text{B}$	$21.32 \pm 3.09\text{C}$	$-30.01 \pm 1.91\text{C}$
全花期(3.596 × 2.406) Full blooming stage	84B	$49.05 \pm 1.52\text{A}$	$23.07 \pm 0.91\text{B}$	$-13.92 \pm 0.80\text{C}$	$26.95 \pm 1.05\text{B}$	$-31.10 \pm 1.31\text{C}$
末花期(4.258 × 2.351) Late blooming stage	84B	$51.94 \pm 1.76\text{A}$	$17.27 \pm 1.94\text{C}$	$-10.66 \pm 0.55\text{B}$	$20.31 \pm 1.89\text{C}$	$-31.81 \pm 1.99\text{C}$

注: ¹ 括号内数据表示花径大小 (横径 × 纵径, cm × cm); ² A、B、C 代表多重比较 SNK 检验在 $P = 0.01$ 显著性水平下的不同显著性差异。

Note: ¹ Data in the brackets show the flower diameters (horizontal diameter × longitudinal diameter, cm × cm); ² A, B, C show the different significant differences at $P = 0.01$ level in SNK test.

花色从蕾期到初开期变化较明显,之后未见明显变化,总体上在开花过程中由红紫逐渐变为淡紫红色。花色在 CIE $L^*a^*b^*$ 表色系统坐标系上的分布: a^* 值由 28.43 变为 17.27, b^* 值从 -6.96 变到 -10.66, L^* 值从 31.87 变到 51.94, h 由 -13.70° 变为 -31.81° , 表明在开花过程中,花色的红色调减退,蓝色调增强,明度增加,彩度变小,与肉眼观察结果一致。经 ANOVA 分析,不同开花阶段的花色参数 (L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h) 差异极显著。

2.2 迎红杜鹃花中的花色素组成

共检测到了 5 种花青苷 (图 1, A)、8 种黄酮醇和 2 种芳香酸成分 (图 1, B)。

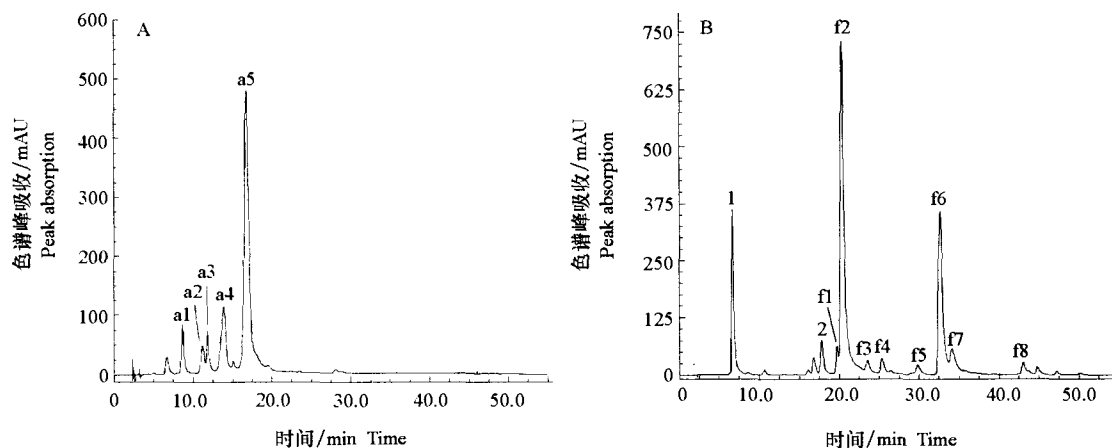


图 1 迎红杜鹃花青苷 (A, 检测波长 520 nm) 和黄酮醇及有机酸 (B, 检测波长 350 nm) 的 HPLC 色谱图

a: 花青苷; f: 黄酮醇。

Fig. 1 HPLC chromatograms of anthocyanins (A, detected at 520 nm), flavonols and organic acids (B, detected at 350 nm) in *R. mucronulatum*

a: Anthocyanin; f: Flavonol.

各个组分的推定结果根据与相应引用的参考文献的紫外—可见吸收光谱、质谱数据进行比较得出 (表 2)。由于某些成分的含量极其微量,故未进行结构推定。

在 520 nm 下检测到 5 个花青苷色谱峰,即 a1 ~ a5。与牡丹的 6 种花青苷的可信对照样品和标准品 Mv3G5G 相比较,在迎红杜鹃花中未检测到 Pg 型色素,可能含有 Cy 和 (或) Pn 型以及 Mv 型花青苷,但没有与牡丹相同的花青苷 (Wang et al., 2001)。各组分在 440 nm 与 $\lambda_{\text{vis-max}}$ 两处的吸光值之比 $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ 分别为 19.0% (a1)、15.9% (a2)、29.8% (a3)、17.2% (a4) 和 14.7% (a5), a1 和 a3 的花青苷元 3 位上,以及 a2、a4 和 a5 的花青苷元 5 位上可能发生了糖苷化 (Harborne, 1958)。且 a1 ~ a5 在紫外 290 ~ 340 nm 波长范围内无特征吸收峰,表明无芳香酸酰化 (Fossen & Andersen, 1998)。

色谱图中的主峰 a5 经一级质谱分析得到分子离子 m/z 625.2 ($[M]^+$), 二级质谱中释放出的碎片离子 m/z 331.1 ($[Y_0]^+$), 为 Mv 苷元的特征质荷比; m/z 493.2 与锦葵素己糖苷一致, m/z 463.2 与锦葵素戊糖苷一致。依据文献 (de Loose, 1969, 1970), 杜鹃属花中含有锦葵素 3, 5 - 二葡萄糖苷及其咖啡酸酰化产物, 且映山红 (*R. simsii*) 杂交品种 ‘Red Wing’ 含有矢车菊素 3 - 阿拉伯糖苷 - 5 - 葡萄糖苷 (Asen & Budin, 1966), 结合对照 Mv3G5G 的紫外吸收数据, 推测 a5 Mv 的 3 位、5 位上均有单糖取代, 推定 a5 为锦葵素 3 - 阿拉伯糖苷 - 5 - 葡萄糖苷。

表 2 迎红杜鹃花色色素的 HPLC - PAD 和 HPLC - ESI - MS 分析及其结构推定

Table 2 HPLC - PAD, HPLC - ESI - MS analysis and tentative identification of flower pigments in *R. mucronulatum*

组分 Peak No.	保留 时间/min Retention time	吸收波长/nm λ_{\max}	分子量 Molecular mass	质谱信息/(m/z) MS/MS ²	推定结果 Tentative identification	参考文献 References
a1	8.6	514, 327 sh, 280	n. a.	n. a.	未推定 No tentation	
a2	11.1	521	n. a.	n. a.	未推定 No tentation	
a3	11.8	524, 348, 277	n. a.	n. a.	未推定 No tentation	
a4	13.8	515, 379 sh, 277	n. a.	n. a.	未推定 No tentation	
a5	16.7	524, 373, 266	625.2	625.2 ([M] ⁺), 493.2, 463.2, 331.1 ([Y ₀] ⁺)	锦葵素 3 - 阿拉伯糖苷 - 5 - 葡萄糖苷 Mv 3-arabinoside-5-glucoside	Asen & Budin, 1966; de Loose, 1969, 1970
f1	19.8	353, 262	480.1	503.1 ([M + Na] ⁺), 319.1 ([Y ₀ + H] ⁺), 185.0	杨梅黄素 3 - 半乳糖苷 My 3-galactoside	Harborne & Williams, 1971
f2	20.4	348, 262	464.1	487.1 ([M + Na] ⁺), 319.1 ([Y ₀ + H] ⁺)	杨梅黄素 3 - 鼠李糖苷 My 3-rhamnoside	Chosson et al., 1998
f3	23.5	352, 256	464.1	487.1 ([M + Na] ⁺), 303.1 ([Y ₀ + H] ⁺), 185.0	槲皮素 3 - 半乳糖苷 Qu 3-galactoside	Harborne, 1962
f4	25.4	353, 256	464.1	487.1 ([M + Na] ⁺), 303.1 ([Y ₀ + H] ⁺), 185.0	槲皮素 3 - 葡萄糖苷 Qu 3-glucoside	Harborne, 1986
f5	29.9	353, 255	448.1	471.1 ([M + Na] ⁺), 457.1, 309.0, 303.1 ([Y ₀ + H] ⁺), 185.0	槲皮素 3 - 鼠李糖苷 Qu 3-rhamnoside	Harborne, 1962; Swiderski et al., 2004
f6	32.8	347, 256	448.1	471.1 ([M + Na] ⁺), 309.0, 303.1 ([Y ₀ + H] ⁺), 185.0	槲皮素 - 鼠李糖苷 Qu-rhamnoside	Harborne, 1962; Swiderski et al., 2004
f7	34.1	346, 265	432.2	455.2 ([M + Na] ⁺), 309.1, 287.1 ([Y ₀ + H] ⁺)	山奈酚 3 - 鼠李糖苷 Km 3-rhamnoside	Harborne, 1986; 中国科学院上海药物所, 1981
f8	43.1	342, 264	n. a.	n. a.	未推定 No tentation	
1	6.7	325, 249	354.2	377.2 ([M + Na] ⁺), 237.0, 225.0, 219.0	绿原酸 Chlorogenic acid	Jin et al., 2005
2	17.8	326, 249	354.2	390.8 ([M + 2H ₂ O] ⁺), 162.6	绿原酸异构体 Chlorogenic acid isomer	Jin et al., 2005

注: n. a.: 未得到数据。M: 糖苷分子; [M]⁺: 糖苷分子离子; [M + H]⁺: 糖苷分子加氢; [M + Na]⁺: 糖苷分子加钠; [M + 2H₂O]⁺: 糖苷分子加 2 水分子; Y₀: 苷元; [Y₀]⁺: 苷元分子离子; [Y₀ + H]⁺: 苷元分子加氢。

Note: n. a.: Data were not available. M: Glycoside molecular; [M]⁺: Glycoside molecular ion; [M + H]⁺: Glycoside molecular ion add hydrogen; [M + Na]⁺: Glycoside molecular ion add sodium; [M + 2H₂O]⁺: Glycoside molecular ion add 2 water moleculars; Y₀: Aglycone; [Y₀]⁺: Aglycone molecular ion; [Y₀ + H]⁺: Aglycone molecular ion add hydrogen.

在 350 nm 下检测到 8 个黄酮醇色谱峰, 即 f1 ~ f8。组分 f1 和 f2 的二级质谱碎片均有 m/z 319.1 ([Y₀ + H]⁺), 与苷元 My 一致, 为 My 的衍生物。糖苷键断裂得到的糖基离子分别为 m/z 162 和 m/z 146。根据 Harborne 和 Williams (1971) 以及 Chosson 等 (1998) 文献, 推定 f1 为杨梅黄素 3 - 半乳糖苷, f2 为杨梅黄素 3 - 鼠李糖苷。

组分 f3 ~ f6 的二级质谱碎片均有 m/z 303.1 ([Y₀ + H]⁺), 与苷元 Qu 一致, 为 Qu 的衍生物。f3 ~ f5 的紫外吸收特征与芦丁极为相似, 为槲皮素的 3 - 糖苷。f3 和 f4 质谱中释放的糖基离子均为 m/z 162, 依据 Cuyckens 和 Claeys (2004) 的文献, 推定 f3 为槲皮素 3 - 半乳糖苷 (Harborne, 1962), f4 为槲皮素 3 - 葡萄糖苷 (Harborne, 1986)。f5 和 f6 的糖基离子均为 m/z 146, 推定为槲皮素的鼠李糖苷, 其中 f5 为槲皮素 3 - 鼠李糖苷 (Harborne, 1962; Swiderski et al., 2004)。

组分 f7 质谱碎片 m/z 287.1 ([Y₀ + H]⁺) 与黄酮醇 Km 和黄酮木犀草素 (Luteolin, 简称 Lu) 一致。根据紫外吸收带 II 的 λ_{\max} , Km 及其糖苷大多在 265 nm 左右, Lu 及其糖苷大多在 255 nm 左右 (中国科学院上海药物研究所, 1981), 并参考文献 (Harborne, 1986), 推定 f7 为山奈酚 3 - 鼠李糖苷。

以可信的金银花提取液为对照样品, 组分 1 的 HPLC 保留时间和紫外吸收数据与金银花中的绿原酸

成分一致。根据 Jin 等 (2005) 的文献, 推定 1 为绿原酸, 2 为其异构体。组分 1 和 2 在计算 TF 时未予以考虑。

2.3 开花过程中花色素含量的变化

在开花过程中, 花色素的总量 TA、TF 以及辅助色素效应指数 CI 从小蕾期到初开期下降幅度较大, 花朵开放后变化幅度较小 (图 2)。各开花阶段的 TA、TF 差异极显著 ($P < 0.01$), 并呈极显著相关 ($r = 0.914$, $P < 0.01$), 黄酮醇可能作为辅助色素与 TA 共同形成迎红杜鹃的淡紫红色。因此, 在开花过程中, 迎红杜鹃花色明度增加, 彩度变淡的变化, 与花色素总量减少、辅助色素效应指数降低有关。

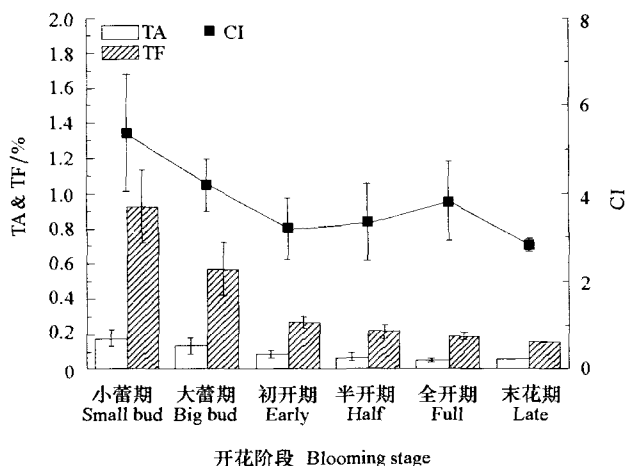


图 2 开花过程中总花青苷含量 (TA)、总黄酮醇含量 (TF) 和辅助色素效应指数 (CI) 的变化

Fig. 2 Changes of total anthocyanins content (TA), total flavonols content (TF) and copigmentation index (CI) during the blooming season

3 讨论

3.1 迎红杜鹃与同属其它杜鹃花的花色素组成的比较

迎红杜鹃的花青苷主要为锦葵素 3-阿拉伯糖苷-5-葡萄糖苷 (相对含量在 70% 以上), 是形成淡紫红花色的主要色素。杜鹃属其它植物中, 紫色花中也以 Mv 型色素为主 (Harnorne, 1962; de Loose, 1969, 1978)。迎红杜鹃黄酮醇类成分与同属其它植物也很相似, 主要为 My、Qu、Km 型糖苷。其中 Qu 糖苷是杜鹃花中广泛存在的黄酮醇 (Harborne, 1971), 其次是 My 糖苷, 为 Mv 糖苷的辅助色素 (Heursel, 1981); Km 糖苷仅存于少数紫色花中 (de Loose, 1969)。在杜鹃属花中存在 5-O-甲基化黄酮醇类物质, 已从白花杜鹃 (*R. mucronatum*)、腋花杜鹃 (*R. racemosum*) 等几十个种中分离到 (Harborne, 1971)。此类化合物作为化学分类标识, 可反映杜鹃花科和亚科水平上的差异 (Harborne, 1969)。迎红杜鹃花中未检测到此类化合物, 推测其遗传背景与含有 5-O-甲基化黄酮醇的种间差异较大。

3.2 开花过程中迎红杜鹃花色和色素含量的变化

迎红杜鹃的花色素合成在花朵开放之前就已达到最高峰, 其后花色素的降解或浓度降低都可能导致花色变淡。本研究中小蕾期的 TA 和 TF 在整个开花过程中均是最大的。草原龙胆 (*Eustoma grandiflorum*) 也有类似现象, 为了避免紫外辐射对细胞的毒害, 其 TF 合成量在花朵满开之前即达到最大, 随后成熟和老化的花瓣中发生色素合成量减少和/或降解增加 (Uddin et al., 2002)。要了解迎红杜鹃

花色素在花瓣中的积累过程,需要对从花芽形成开始到小蕾期之间的色素量的变化进行深入研究。

3.3 耐寒、耐中性和弱碱性的花色新品种的选育策略

为了丰富北京早春的杜鹃花色,需要选育既耐寒又具有其它花色的新品种。目前迎红杜鹃的花色育种目标应该是努力扩大其花色变异。如果能保持迎红杜鹃本身耐寒性强、适中性稍耐弱碱性(pH 7.3~8.2)的优势(陈有民等,1992),再引入具有其它花色的同属植物的种质,将有望扩大以迎红杜鹃为基础的北方耐寒杜鹃的花色变异。

根据花色素组成,迎红杜鹃花色育种可向两个方向进行:红色调和蓝色调花色的育种。杂交育种虽不能产生色调迥异的新花色,但可以产生较大的花色变异(Heursel, 1981)。且杜鹃属植物具有丰富的红色花种质资源,通过种间杂交有望获得理想的新品种。红色杜鹃花中以 Cy 型色素为主(Harborne, 1962; Asen & Budin, 1966; de Loose, 1969, 1970),若育红色花品种,需要使花瓣中富集 Cy 和(或)Pg 型色素,同时减少 Mv 的含量。可选择富含 Cy 型色素的种,如映山红(*R. simsii*)、半圆叶杜鹃(*R. thomsonii*)、皋月杜鹃(*R. indicum*)等,或品种如 *R. simsii* cv. 'Red Wing' 等作为亲本与迎红杜鹃杂交,并借助生物技术克服属内杂交不亲和性障碍(Heursel, 1981; de Schepper et al., 2001)。值得注意的是,迎红杜鹃含有黄酮醇 My 和花青素 Mv,即存在生成蓝色色素 Dp 的前体及下游产物。可以降低甲基转移酶(OMT)的活性,抑制 Mv 的生成,以积累 Dp 色素;或者降低黄酮醇合酶(FLS)的活性,积累二氢杨梅黄素,以促进 Dp 的生成。目前月季花色分子育种中,利用基因工程技术已得到花瓣中积累 Dp 色素含量高达 95% 的新奇的蓝色花(Katsumoto et al., 2007),其经验可供杜鹃蓝色花的分子育种借鉴。

黄酮醇和黄酮(flavone)的辅助色素效应对花色也有重要影响。Heursel (1981) 研究发现映山红杂交后代中,出现了独特的带蓝色调的花色,是由于黄酮醇的存在产生了花色偏蓝的效果。但是,本研究发现迎红杜鹃的辅助色素效应指数 CI 在小蕾期以后均小于 5,表明其黄酮醇的辅助色素效应不强(Asen et al., 1971; Sakada et al., 1995)。根据 Heursel (1981) 的研究,黄酮醇含量高的植株的花色取决于花青苷的含量。花青苷含量低,花色偏蓝。因此,筛选合适的亲本与迎红杜鹃杂交,调节杂交后代中花青苷和黄酮醇(如 My 和 Qu)含量的合理配比,增强辅助色素效应后,则有助于花色变异的扩大。其次,从迎红杜鹃花瓣中未检出黄酮,若能通过分子育种手段促进黄酮的生成,也将对迎红杜鹃的花色产生一定的变异效果,这将是未来研究中有意义的尝试。

此外,迎红杜鹃花中含有的绿原酸、槲皮素等药用成分,具有抗菌、抗炎、抗病毒等药效,从综合利用角度,除园林应用外,该植物还具有一定的药用开发前景。

References

- Asen S, Budin P S. 1966. Cyanidin 3-arabinoside-5-glucoside, an anthocyanin with a new glycosidic pattern, from flowers of "Red Wing" azaleas. *Phytochemistry*, 5 (6): 1257 - 1261.
- Asen S, Stewart R N, Norris K H. 1971. Co-pigmentation effect of quercetin glycosides on absorption characteristics of cyanidin glycosides and color of Red Wing azalea. *Phytochemistry*, 10 (1): 171 - 175.
- Chen You-min, Wang Yu-hua, Yu Jiu, Yu Shu-jun, Zhang Zuo-shuang, Zhang Zhi-ming. 1992. A study on the introduction of Korean azalea to Beijing plain. *Journal of Beijing Forestry University*, 14 (4): 111 - 118. (in Chinese)
- 陈有民, 王玉华, 俞玖, 郁书君, 张佐双, 张治明. 1992. 迎红杜鹃引种北京平原的研究. *北京林业大学学报*, 14 (4): 111 - 118.
- Chosson E, Chaboud A, Chulia A J, Raynaud J. 1998. Dihydroflavonol glycosides from *Rhododendron ferrugineum*. *Phytochemistry*, 49 (5): 1431 - 1433.
- Cuyckens F, Claeys M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39 (1): 1 - 15.
- de Loose R. 1969. The flower pigments of the Belgian hybrids of *Rhododendron simsii* and other species and varieties from *Rhododendron subseries obtusum*. *Phytochemistry*, 8 (1): 253 - 259.

- de Loose R. 1970. Flavonoid glycosides in the petals of some *Rhododendron* species and hybrids. *Phytochemistry*, 9 (4): 875 – 879.
- de Loose R. 1978. *Azalea indica* flower colour as related to the parameters pH, anthocyanins and flavonol co-pigments. *Scientia Horticulturae*, 9 (3): 285 – 290.
- de Schepper S, Leus L, Mertens M, Debergh P, van Bockstaele E, de Loose M. 2001. Somatic polyploidy and its consequences for flower coloration and flower morphology in azalea. *Plant Cell Reports*, 20 (7): 583 – 590.
- Fossen T, Andersen M. 1998. Cyanidin 3-O- (6'-succinyl- β -glucopyranoside) and other anthocyanins from *Phragmites australis*. *Phytochemistry*, 49 (4): 1065 – 1068.
- Harborne J B. 1958. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Journal of Biochemistry*, 70 (1): 22 – 28.
- Harborne J B. 1962. Plant polyphenols; 5. Occurrence of azalein and related pigments in flowers of *Plumbago* and *Rhododendron* species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 96 (1): 171 – 178.
- Harborne J B. 1965. Plant polyphenols-XV: Flavonols as yellow flower pigments. *Phytochemistry*, 4 (5): 647 – 657.
- Harborne J B. 1969. Occurrence of flavonol 5-methyl ethers in higher plants and their systematic significance. *Phytochemistry*, 8 (2): 419 – 423.
- Harborne J B. 1986. Flavonoid patterns and phytogeography: the genus *Rhododendron* section *Vireya*. *Phytochemistry*, 25 (7): 1641 – 1643.
- Harborne J B, Williams C A. 1971. Leaf survey of flavonoids and simple phenols in the genus *Rhododendron*. *Phytochemistry*, 10 (11): 2727 – 2744.
- Hayashi K. 1988. Plant pigments (Enlarged edition), Tokyo: Yokendo, Ltd; 489. (in Japanese)
- Heursel J. 1981. Diversity of flower colours in *Rhododendron simsii* Planch. and prospects for breeding. *Euphytica*, 30 (1): 9 – 14.
- Jin U H, Lee J Y, Kang S K, Kim J K, Park W H, Kim J G, Moon S K, Kim C H. 2005. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sciences*, 77 (22): 2760 – 2769.
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton T A, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao G Q, Nehra N S, Lu C Y, Dyson B K, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason J G, Tanaka Y. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant and Cell Physiology*, 48 (11): 1589 – 1600.
- Macz-Pop G A, Rivas-Gonzalo J C, Pérez-Alonso J J, González-Paramás A M. 2006. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 94 (3): 448 – 456.
- Miyajima I, Ureshino K, Kobayashi N, Akabane M. 2000. Flower color and pigments of intersubgeneric hybrid between white-flowered evergreen and yellow-flowered deciduous azaleas. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 69 (3): 280 – 282.
- Phytochemistry Laboratory, Shanghai Institute of Materia Medica, CAS. 1981. Identification handbook of flavonoid compounds, Beijing: Science Press; 448 – 475. (in Chinese)
- 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室. 1981. 黄酮体化合物鉴定手册. 北京: 科学出版社: 448 – 475.
- Pomar F, Novo M, Masa A. 2005. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1094 (1 – 2): 34 – 41.
- Sakada Y, Aoki N, Tsunematsu S, Nishikouri H, Johjima T. 1995. Petal coloration and pigmentation of tree peony bred and selected in Daikon Island (Shimane Prefecture). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64 (2): 351 – 357.
- Swaroop A, Gupta A P, Sinha A K. 2005. Simultaneous determination of quercetin, rutin and coumaric acid in flowers of *Rhododendron arboreum* by HPTLC. *Chromatographia*, 62 (11): 649 – 652.
- Swiderski A, Muras P, Koloczek H. 2004. Flavonoid composition in frost-resistant *Rhododendron* cultivars grown in Poland. *Scientia Horticulturae*, 100 (1 – 4): 139 – 151.
- Uddin A F M J, Hashimoto F, Nishimoto S I, Shimizu K, Sakata Y. 2002. Flower growth, coloration and petal pigmentation in four *Lisianthus* cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 71 (1): 40 – 47.
- Wang L S, Hashimoto F, Shiraishi A, Aoki N, Li J J, Shimizu K, Sakata Y. 2001. Phenetics in tree peony species from China by flower pigment cluster analysis. *Journal of Plant Research*, 114 (3): 213 – 221.
- Zhang J J, Wang L S, Shu Q Y, Liu Z A, Li C H, Zhang J, Wei X L, Tian D K. 2007. Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony. *Scientia Horticulturae*, 114 (2): 104 – 111.